

REGENERACJA KOŃCZYN U PŁAZÓW

Leopold Śliwa (Kraków)

Odwiecznym marzeniem ludzi jest możliwość odrastania, regeneracji utraconych w wyniku stanów chorobowych lub wypadków części ciała. Jest to również interesujący i ważny, a zarazem nierozwiązany problem współczesnej medycyny. Możliwość odrosnięcia przykładowo, utraconej kończyny mogłaby być kapitalną metodą leczenia i tym samym polepszania komfortu życiowego pacjentów. W dawnych wiekach możliwość pobudzania takiego procesu usiłowano uzyskać stosując różne, całkowicie nieskuteczne, zabiegi magiczne lub religijne. Opierały się one na wierze w możliwość wyzwolenia interwencji zewnętrznych, nadprzyrodzonych sił, mogących uszczęśliwić poszkodowanych ludzi. Oczywiście takie działania nie mogły być skuteczne, więc zwrócono się w stronę nauki i prób wyjaśnienia możliwości regeneracyjnych organizmu i mechanizmów przebiegu i regulacji tego procesu. Dość wcześnie przyrodnicy i lekarze zwrócili uwagę, że wśród zwierząt występują gatunki, u których odrastanie utraconych kończyn jest normalnym procesem życiowym, ułatwiającym ran-
nym osobnikom przetrwanie w środowisku. Zwierzęta te stały się organizmami modelowymi w badaniach, których celem jest poznanie zjawiska regeneracji, a po zgromadzeniu odpowiedniej wiedzy indukowaniem procesów regeneracyjnych u człowieka.



Ryc. 1. Neoteniczny, pozostający przez całe życie larwą gatunek salamandry Axolotl meksykański (*Ambystoma mexicanum*) doskonale regenerujący kończyny obiekt badań eksperymentalnych. Źródło: https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRjefRLcVBmHXDaSLcEJB_U_gyT3aaD8nG_d4qJ2oNqW0y2YWfsbA.

Pierwsze obserwacje i badania doświadczalne procesów regeneracji kończyn u salamander wykonał przyrodnik włoski Spallanzani, przedstawiając ich wyniki w dziele medycznym wydanym w roku 1769. Stwierdził, że liczne gatunki tych płazów są zdolne do pełnej i prawidłowej odbudowy utraconej kończyny. Taki typ określany mianem regeneracji normalnej, czyli homomorficznej jest charakterystyczny dla płazów ogoniastych (*Urodela*) należących do rodzin *Ambystomidae*, *Salamandridae* i *Plethodontidae*. U gatunków reprezentujących ten typ, nowa odrastająca kończyna staje się pod względem morfologicznym, histologicznym i czynnościowym zupełnie podobna do amputowanej. U płazów bezogonowych (*Anura*), u większości gatunków z rodzin *Discoglossidae*, *Pipidae* i nielicznych gatunków z pośród *Hylidae* i *Ranidae*, regeneracja nie jest całkowita, a w miejscu utraconego odnoża tworzy się kikutowaty, pozbawiony palców, wyrostek niepodobny pod żadnym względem do naturalnej kończyny. Taki typ regeneracji nazywany jest częściową czyli heteromorficzną. Wśród płazów, znane są również gatunki całkowicie niezdolne do regeneracji, u których rany powstałe po amputacji kończyny szybko się zablizniają i na tym kończy się ich gojenie. Taki stan rzeczy spotykany jest zwłaszcza w rodzinie *Bufonidae*, gdzie wszystkie badane gatunki są całkowicie niezdolne do regeneracji. Interesujący jednak jest fakt, że larwy gatunków, których dorosłe osobniki nieprawidłowo regenerują kończyny, są zdolne do pełnego i prawidłowego ich odrastania. Generalnie można stwierdzić, że wiek zwierzęcia, a przede wszystkim jego aktualne stadium rozwojowe, ma wpływ na zdolność do regeneracji. Im organizm jest młodszy, tym zmiany regeneracyjne są szybsze, a odrastająca kończyna bardziej prawidłowa. Przełomowym momentem jest w tym przypadku okres metamorfozy z larwy w osobnika dorosłego. W okresie tym często następuje zmiana środowiska życia z wodnego na lądowe, co nie

pozostaje bez wpływu na zdolność do odtwarzania utraconych kończyn. W wodzie regeneracja przebiega łatwiej i szybciej, jak również rzadziej pojawiają się zaburzenia i patologie. W środowisku lądowym odrastanie utraconej kończyny jest trudniejsze, co może wynikać z większego prawdopodobieństwa możliwości uszkodzenia delikatnych tkanek formującej się blastemy regeneracyjnej, zabrudzenia rany, czy różnego typu infekcji, lub wywołujących się stanów zapalnych. Na regenerację nie wydaje się mieć wpływ poziom cięcia amputacyjnego. U gatunków zdolnych do normalnej regeneracji, odcięcie kończyny w połowie ramienia, lub przedramienia prowadzi do podobnych efektów końcowych jej odrastania. W aspekcie ewolucyjnym, systematycznym i rozwojowym wymaga jednak wyjaśnienia związek zdolności do tego procesu z genomem osobników i przebiegiem aktywności genów, szczególnie w okresie rozwojowym i różnicowania się komórek, następującym po okresie ich intensywnej proliferacji i namnażania w regeneracyjnej blastemie. Zagadnienie to wymaga intensywnych badań molekularnych i genetycznych polegających na porównywaniu aktywności genów w komórkach blastemy z komórkami rozwijających się w okresie embrionalnym kończyn.



Ryc. 2. Regenerujący w sposób prawidłowy przednią kończynę osobnik traszki *Notophthalmus viridescens*. Źródło: <https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRYjFtWsSeMQ0HayVsdBR117dPiTCy62JTA9xf9kOB9VW9d8W-K>.

Podstawowym momentem, dla możliwości oraz prawidłowego przebiegu procesu regeneracji jest samo jej zainicjowanie i rozpoczęcie. Czynnikiem decydującym o sukcesie jest pozostawienie odkrytej rany amputacyjnej. Jej pokrycie przez fałdy skórne kończyny uniemożliwia regenerację, a fałdy skórne szybko zrastają się i powierzchnia amputacyjna ulega zabliznieniu, co uniemożliwia odrastanie kończyny. Pozostawienie odkrytej powierzchni rany po amputacyjnej powoduje w pierwszym momencie jej szybkie pokrycie komórkami podobnymi do nabłonkowych lub fibroblastycznych, które jak się sugeruje, wywodzą się z tkanek w okolicy zranionego miejsca. Prawdopodobnie pochodzą one z odróżnicowanych komórek mięśniowych, komórek macierzystych lub immunokompetentnych komórek gromadzących się naturalnie w miejscach uszkodzenia tkanek. Taki stan

stymuluje i umożliwia intensywne podziały komórkowe, co prowadzi do formowania się grupy prymitywnych, nieodróżnicowanych, a za to zdolnych do intensywnej proliferacji komórek nazywanych blastemą regeneracyjną. Struktura ta, w procesie dalszego namnażania komórek i późniejszego ich różnicowania, odtwarza elementy histologiczne odrastającej prawidłowo kończyny. Jednak do chwili obecnej nie udało się jednoznacznie stwierdzić jakie czynniki i mechanizmy są za taki proces odpowiedzialne.



Ryc. 3. Stadia regeneracji kończyny Axolotla (*Ambystoma mexicanum*). Źródło: <https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcS77nO3uU14PmIKskE8AsFM-H4HTX3BANrwejDapVJkOLqriu0ag>.

Jedną z pierwszych koncepcji usiłujących to wyjaśnić była teoria neuralna, w myśl której za kierowanie regeneracją w okresie inicjacyjnym i wczesnoblastematycznym odpowiedzialna jest liczba aksonów obecnych na przekroju amputowanej kończyny. Stwierdzono doświadczalnie, że liczba aksonów na przekroju regenerującej prawidłowo kończyny traszki *Notophthalmus viridescens* jest bardzo wysoka, podczas gdy u nieregenerującej żaby *Rana pipiens* stosunkowo niska. Natomiast u zdolnego jedynie do częściowej, heteromorficznej regeneracji gatunku *Xenopus laevis*, liczba ta ma wartość pośrednią. W późniejszym okresie procesu regeneracji, podczas wzrostu blastemy, a zwłaszcza różnicowania się jej prymitywnych komórek na tkanki, nerwy nie wydają się mieć istotnego znaczenia. Hipotezę tą zdaje się wspierać wynik drastycznego doświadczenia polegającego na przemieszczeniu nerwów, jakie przeprowadzono na dorosłych, regenerujących heteromorficznie osobnikach *Xenopus laevis*. W jego trakcie wypreparowany z tylnej kończyny nerw kulszowy przemieszczano po skórą zwierzęcia i wyprowadzano przez kikut świeżo amputowanej kończyny przedniej. Po takim zabiegu i wprowadzeniu do rany dużej wiązki neuronów, w miejscu amputacji formowała się prawidłowa blastema regeneracyjna, z której ostatecznie rozwijało się normalne i funkcjonalne odnóże.

Drugim, obok neuralnego, czynnikiem mogącym mieć znaczenie w inicjacji i prawidłowym przebiegu regeneracji są zmiany hormonalne obserwowane u poddanych amputacji kończyny zwierząt. Jak wykazano eksperymentalnie, w fazie początkowej procesu ważna jest prawidłowa reakcja i funkcjonowanie przysadki mózgowej. Do jej hormonów należą, w pierwszym rzędzie, ACTH i TSH, czyli stymulatory nadnerczy i tarczycy. Prawidłowa sekrecja

wymienionych gruczołów obwodowych jest, jak się wydaje, ważnym czynnikiem fizjologicznym wpływającym na proces regeneracji. Kortykosterydy nadnerczowe są istotne, między innymi, dla łagodzenia stresu pourazowego, a przede wszystkim dla wstępnych etapów zabezpieczania rany pourazowej przed zakażeniami i powodowania prawidłowego jej gojenia. Mają również znaczenie w stymulacji komórkowego układu odpornościowego, wspomagając migracje do rany i aktywność fagocytarną i sekrecyjną makrofagów. Tyroksyna (hormon tarczycy) reguluje w blastemie regeneracyjnej procesy różnicowania się histologicznego komórek. Eksperymentalnie udowodniono, że zwierzęta pozbawione tarczycy, lub takie, u których farmakologicznie zablokowano jej aktywność wydzielniczą, po zagojeniu się rany poamputacyjnej i początkowym rozwoju blastemy nie przeprowadzają dalszej regeneracji kończyny, gdyż komórki regeneratu, zachowując zdolność do podziałów mitotycznych, nie są zdolne do zmiany swojej morfologii i fizjologii w kierunku odtwarzania tkanek budujących odrastającą kończynę. Bardzo ważnym jest również odpowiednie stężenie hormonu wzrostu (somatotropina, STH), który ma istotny wpływ na tempo podziałów mitotycznych młodych komórek w formującej się blastemie. Namnażanie się komórek jest podstawowym mechanizmem formowania i wzrostu blastemy, dostarczającym odpowiedniej ilości pluripotencjalnych komórek, mogących w dalszych okresach regeneracji różnicować się w ostateczne tkanki.

W ostatnich latach badań nad regeneracją zwrócono uwagę na rolę migrujących w organizmie – makrofagów, fagocytarnych komórek układu odpornościowego. W przypadku płazów mają one inne właściwości, niż u ssaków. Są one bardzo zbliżone do komórek macierzystych. Ich znaczenie, zwłaszcza w okresie inicjacji procesów odrastania kończyn udowodniono u płazów w trakcie eksperymentu, polegającego na eliminacji komórek odpornościowych z organizmu. Salamandry normalnie regenerowały prawidłowe kończyny jedynie wtedy, gdy poziom makrofagów był u nich prawidłowy. Pozbawienie zwierząt makrofagów poprzez zablokowanie ich proliferacji prowadziło do zahamowania możliwości regeneracyjnych. Salamandry pozbawione makrofagów goiły rany poamputacyjne, które szybko ulegały zabliźnieniu bez rozpoczęcia procesów regeneracji i formowania blastemy. Zwierzęta z częściowo zablokowanym procesem proliferacji makrofagów, mające ich niski poziom, były zdolne jedynie do częściowej regeneracji. Powstawała u nich blastema, która po wzroście, pozostawała ostatecznie jako kikutowaty,

niezróżnicowany wyrostek nie przypominający prawidłowej kończyny.

Jak się wydaje makrofagi migrujące w dużej liczbie do rany po utraconej kończynie są odpowiedzialne za procesy immunologiczne. Nie dopuszczają do zakażenia rany i wywiązania się stanu zapalnego. Oczyszczają ranę z materiałów zewnętrznych, takich jak zabrudzenia, czy bakterie oraz fagocytując uszkodzone i martwe komórki pozostawiają jedynie zdrowe i zdolne do dalszych zmian elementy komórkowe tkanek. Biorą również udział w formowaniu fibroblastów i komórek nabłonkowych pokrywających ostatecznie ranę. Stwierdzono również, że dzięki ich obecności pojawia się możliwość odróżnicowania komórek kostnych i mięśniowych oraz proliferacja tak powstałych komórek podobnych do macierzystych, co w konsekwencji prowadzi do prawidłowego uformowania i rozwoju blastemy regeneracyjnej dostarczającej materiału komórkowego do różnicowania i kształtowania się prawidłowych elementów morfologicznych odnawianej kończyny. Szczególnie ważną jest w tym procesie możliwość oddziaływania płazich makrofagów na biorące udział w regeneracji fibroblasty, polegające na zahamowaniu produkcji przez nie białek macierzy międzykomórkowej odpowiedzialnej za formowanie blizny. Brak możliwości bliźnowacenia rany jest w przypadku odtwarzania kończyny kluczowy. Makrofagi mają również znaczenie w lokalnej regulacji aktywności genów komórek proliferujących i różnicujących się w obrębie blastemy. Wykazano, że podobnie jak w zarodkowym rozwoju kończyny kluczową rolę ogrywa aktywność genów *Fgf8* i *Wnt7a*, najaktywniejszych w początkowych etapach procesu i blokowanych stopniowo w miarę jego przebiegu i formowania elementów kości, mięśni i skóry kończyny. Makrofagi wpływają również na właściwości i zachowanie tkankowo specyficznych komórek macierzystych, które są stosunkowo liczne u płazów, szczególnie w okresie największej ich zdolności do regeneracji, czyli u larw. Po uszkodzeniu tkanek stają się one wyjątkowo aktywne podziałowo oraz łatwo podlegają wielokierunkowemu różnicowaniu. Ich badania zwłaszcza w aspekcie genetycznym i molekularnym mogą stanowić obiecujący kierunek umożliwiający uzyskanie danych koniecznych do wyjaśniania omawianej, szczególnej zdolności płazów.

Oddziaływanie makrofagów na komórki w okolicy rany w celu zmiany cytofizjologii i uzyskania przez nie zdolności do proliferacji i różnicowania wydaje się zależeć od bezpośrednich kontaktów międzykomórkowych. Styk błon sąsiadujących komórek może być w tym przypadku decydujący dla przekazywania

sygnału morfogenetycznego, modyfikującego aktywność genetyczną i pozycjonowanie komórek, co prowadzi do podobnego jak w okresie embrionalnym kształtowania się elementów kończyny, jej mięśni, szkieletu oraz naczyń krwionośnych i skóry. Nie bez znaczenia są również zdolności sekrecyjne, czyli wydzielanie chemicznych sygnałów parakrynowych. Ich obecność w odpowiednim gradiencie stężenia, zmieniającym się zarówno w obrębie tkanek, jak również w czasie regeneracji odgrywa, zdaniem badaczy tego procesu, istotną rolę w przebiegu wzrostu blastemy i jej przekształcania się w prawidłową kończynę. Interesującym jest zagadnienie szybkiego wzrostu liczności makrofagów w uszkodzonej kończynie. Ich migracja i gromadzenie się w okolicy rany ma charakter chemotaktyczny. Są one przywabiane i zatrzymywane w miejscu cięcia. Takie ich zachowanie zależy od chemicznych czynników, które są, jak wykazano, wydzielane przez uszkodzone aksony komórek nerwowych. Te obserwacje wyjaśniają związek ilości uszkodzonych zakończeń nerwowych ze zdolnością do regeneracji. Pomimo znacznych postępów

w badaniach i wyjaśnianiu tajemniczej zdolności płazów do odrastania utraconych części ciała, nadal jest jednak daleko do pełnego poznania tego procesu.

Rodzi się jednak pytanie o to, czy można będzie wykorzystać uzyskane informacje u człowieka. Jak wiadomo ssaki i tym samym ludzie nie mają zdolności do prawidłowej regeneracji kończyn czy przynajmniej palców. Wiadomo, że ludzie mogą regenerować końcówki, opuszki palców, a zdolność ta jest szczególnie duża u dzieci. Ale już odrastanie całych paliczków palców nie jest możliwe. Badanie procesów biologicznych człowieka jest utrudnione, przede wszystkim ze względów etycznych, stąd próby eksperymentów przeprowadzanych na myszach, u których opisano możliwość regeneracji paliczków u płodów oraz bardzo młodych noworodków. Badania te są jednak trudne metodycznie, a uzyskiwane do tej pory wyniki często sprzeczne. Rodzi to konieczność poszukiwania innych modelowych organizmów, a w chwili obecnej najbardziej obiecującymi w tym zakresie są jednak jedynie płazy.